

**METHOD FOR ASSAYING NUCLEIC ACID ENCODING EOTAXIN, RANTES OR BETA-DEFENSIN-2, REAGENT THEREFOR, AND METHOD FOR SCREENING ANTIINFLAMMATORY AGENT**

**Patent number:** JP2002186485  
**Publication date:** 2002-07-02  
**Inventor:** SHIBATA MICHIO; HARIGAI TAKESHI; ICHIKAWA HIDEYUKI  
**Applicant:** SHISEIDO CO LTD  
**Classification:**  
- international: **A61K45/00; A61P29/00; A61P37/08; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566; A61K45/00; A61P29/00; A61P37/00; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566; (IPC1-7): C12N15/09; A61K45/00; A61P29/00; A61P37/08; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566**  
- european:  
**Application number:** JP20000391265 20001222  
**Priority number(s):** JP20000391265 20001222

[Report a data error here](#)

**Abstract of JP2002186485**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a specific combination of primers and a probe effective for assaying a nucleic acid encoding eotaxin, RANTES or  $\beta$ -defensin-2 that are known to promote the short-circuited consumption of energy. **SOLUTION:** A method for assaying a gene as a template by PCR using a pair of PCR primers and a probe that hybridizes to a site between the primers on a template and is bound to a reporter and a quencher, wherein the method permits assaying a gene, particularly an mRNA, encoding eotaxin, RANTES or  $\beta$ -defensin-2 and a kit therefor are provided. These are useful for evaluating or selecting a substance having an antiinflammatory activity.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-186485

(P2002-186485A)

(43) 公開日 平成14年7月2日 (2002.7.2)

|                                      |       |               |             |
|--------------------------------------|-------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>           | 識別記号  | F I           | シーコード (参考)  |
| C 1 2 N 15/09                        | Z N A | A 6 1 K 45/00 | 2 G 0 4 5   |
| A 6 1 K 45/00                        |       | A 6 1 P 29/00 | 4 B 0 2 4   |
| A 6 1 P 29/00                        |       | 37/08         | 4 B 0 6 3   |
| 37/08                                |       | C 1 2 Q 1/68  | A 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 Q 1/68                         |       | G 0 1 N 33/15 | Z           |
| 審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 17 頁) 最終頁に続く |       |               |             |

(21) 出願番号 特願2000-391265 (P2000-391265)

(22) 出願日 平成12年12月22日 (2000. 12. 22)

(71) 出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72) 発明者 柴田 道男

神奈川県金沢区福浦2-12-1 株式会社

資生堂リサーチセンター内

(72) 発明者 針谷 毅

神奈川県金沢区福浦2-12-1 株式会社

資生堂リサーチセンター内

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2の核酸の測定方法及びそのための試薬、並びに抗炎症剤のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2をコードする遺伝子の新規な測定方法及びそれを利用した抗炎症活性物質の評価又は選択方法の提供。

【解決手段】 1 対のPCR プライマーと、鋳型上の該プライマーに挟まれた位置にハイブリダイズする、レポーターとクエンチャーを結合したプローブを用いて、PCR法により鋳型としての遺伝子を測定する方法において、特定のプライマーと特定のプローブとを用いて、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2をコードする遺伝子特にmRNAを測定する方法、並びにそのためのキットを提供する。これらは、抗炎症作用を有する物質の評価又は選択のために有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによりエオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2のmRNA又はcDNAを測定する方法において、

(1) エオタキシンをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてエオタキシンをコードする核酸のヌクレオチド170～189の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド301～320の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド191～223の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、あるいは、

(2) RANTESをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてRANTESをコードする核酸のヌクレオチド50～71の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド274～300の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド73～94の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、あるいは、

(3) β-ディフェンシン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてβ-ディフェンシン-2をコードする核酸中のヌクレオチド84～104の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド276～295の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド108～139の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる；ことを特徴とするmRNA又はcDNAの測定方法。

【請求項2】 前記プライマー及びプローブが20～40のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記プライマー及びプローブが次のヌクレオチド配列；

エオタキシン遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCAGCTTCTGTCCCAACCA-3' (配列番号：4)

リバースプライマー 5'-GGCACAGATATCTTGGCCA-3' (配列番号：5)

プローブ 5'-CTGCTGCTTAACTCGGCCAATAGGAAGATACC-3' (配列番号：6)

を有するか、あるいは

RANTES遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-CGCTCTCATCTCATTTGCTACT-3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5'-AGCTCATCTCCAAGAGTTGATGTA-3' (配列番号：8)

プローブ 5'-CCCTCTGGCTCTGTCATCTGC-3' (配列番号：9)；または

β-ディフェンシン遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCCTCTCCAGGTGTTTTGG-3' (配列番号：10)

リバースプライマー 5'-CGCACGCTCTGATCGGGA-3' (配列番号：11)

プローブ 5'-TATAGGCGATCTCTTAACTGCTTAAAGTGG-3' (配列番号：12)

を有するか、あるいは該配列中の4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加により修飾されており、且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を有する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 対照としてさらに、グリセロールデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド66～84の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、他方のプライマーとしてヌクレオチド272～291の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、そしてプローブとしてヌクレオチド242～262の領域のオリゴヌクレオチドを用いて、グリセロールデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ遺伝子を測定する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記グリセロールデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ測定用として、次のヌクレオチド配列；

フォワードプライマー 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (配列番号：13)

リバースプライマー 5'-GAAGATGTGATGGGATTTTC (配列番号：14)

プローブ 5'-AGGCTGAGAACGGGAAGCTTG (配列番号：15)

を有するか、又は4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加により修飾されており且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブを用いる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを含んで成る、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによりエオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2のmRNA又はcDNAを測定するためのキットであって、

(1) エオタキシンをコードするmRNA又はcDNAを測定す

るために、前記一方のプライマーとしてエオタキシンをコードする核酸のヌクレオチド170～189の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド301～320の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド191～223の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、

(2) RANTESをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてRANTESをコードする核酸のヌクレオチド50～71の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド274～300の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド73～94の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、

(3)  $\beta$ -ディフェンシン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとして $\beta$ -ディフェンシン-2をコードする核酸中のヌクレオチド84～104の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド276～295の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド108～139の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；を含み、前記プライマー及びプローブが15～40個のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、ことを特徴とするmRNA又はcDNAの測定用キット。

【請求項7】 前記プライマー及びプローブが20～30のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、請求項6に記載のキット。

【請求項8】 前記プライマー及びプローブが次のヌクレオチド配列；

エオタキシン遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCAGCTCTCTGCCAACCA-3' (配列番号：4)

リバースプライマー 5'-GGCACAGATATCTTGCCA-3' (配列番号：5)

プローブ 5'-CTGCTGCTTAACTCGGCCAATAGGAAGATACC-3' (配列番号：6)；

または

RANTES遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-CGCTCTCATCTCATTTGCTACT-3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5'-AGCTCATCTCCAAAGAGTTGATGTA CT-3' (配列番号：8)

プローブ 5'-CCCTCTGGGCTCTCGCATCTGC-3' (配列番号：9)；または

$\beta$ -ディフェンシン-2遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCTCTCCAGGTGTTTTTGG-3' (配列番号：10)

リバースプライマー 5'-CGCAGCTCTCTGATGAGGAG-3'

(配列番号：11)

プローブ 5'-TATAGGCGATCTGTTACTGCTTAAGAGTGG-3' (配列番号：12)

を有するか；あるいは該配列中の4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており、且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を有する、請求項6又は7に記載のキット。

【請求項9】 対照としてさらに、グリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド66～84の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとしてヌクレオチド272～291の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及びプローブとしてヌクレオチド242～262の領域のオリゴヌクレオチドを含む請求項6～8のいずれか1項に記載のキット。

【請求項10】 前記グリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ測定用として、次のヌクレオチド配列；

フォワードプライマー 5'-GAAGGTGAAGGTCGAGTC (配列番号：13)

リバースプライマー 5'-GAAGATGGTGAAGGATTTC (配列番号：14)

プローブ 5'-AGGCTGAGAACGGGAAGCTTG (配列番号：15)

を有するか、又は4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブを用いる、請求項9に記載のキット。

【請求項11】 抗炎症作用を有する薬剤の評価又は選択方法において、エオタキシン、RANTES又は $\beta$ -ディフェンシン-2を発現し得る細胞を被験試料の存在下で培養し、エオタキシン、RANTES又は $\beta$ -ディフェンシン-2をコードするmRNAの量を請求項1～5のいずれか1項に記載の方法、又は請求項6～10のいずれか1項に記載のキット、により測定することを特徴とする方法。

【請求項12】 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法により、又は請求項1～10のいずれか1項に記載のキットにより評価された薬剤活性成分とする抗炎症剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、エオタキシン、RANTES又は $\beta$ -ディフェンシン-2のmRNA又はcDNAの測定方法及びそのためのキットに関する。本発明は、例えば抗炎症剤のスクリーニング方法又はアトピー性皮膚炎の治療剤のスクリーニング方法として有用である。

【0002】

【従来の技術】 皮膚の刺激性炎症又はアレルギー性炎症の際には、炎症部位に好中球や好酸球などの炎症細胞が

遊走し、活性化され、炎症の発生に関与することが知られており、この場合に炎症細胞の遊走及び活性化に関与するケモカイン(chenokine)としてインターロイキン-8 (IL-8)、エオタキシン (eotaxin)、RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Expressed and Secreted)、 $\beta$ -ディフェンシン-2などが知られている。

【0003】従って、炎症細胞によるこれらのケモカインの産生を抑制する物質を選択することにより抗炎症剤の選択が可能となる。この場合、ケモカインの産生を測定する方法としては、生成したIL-8、エオタキシン、などを測定する方法が考えられるが、より直接的、高感度にこれらのケモカインの発現を測定するには、それらをコードするmRNAを測定するのが好ましい。しかしながら、遺伝子発現の定量的な測定は従来から困難であり、コンパティブルPCR法、コンパティブルPCR法、ノーザンブロッティング法等によって半定量されていた。

【0004】ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)は核酸の増幅方法として広く使用されている。このPCR法の1用途として、リポーター色素1とクエンチャー色素2を結合させたプローブを用いて核酸を測定する方法がある。この方法においては、PCR法において使用するフォワードプライマーがハイブリダイズする鋳型上の部位とリバースプライマーがハイブリダイズする鋳型上の部位とに挟まれた鋳型上の部位にハイブリダイズし、且つリポーター色素1とクエンチャー色素2が結合しているプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行う。

【0005】例えば、図1の(A)～(D)において、フォワードプライマーがDNAポリメラーゼの使用により伸長してプローブに対すると、プローブを構成するオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼが有する5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の作用により分解され、その後を追ってフォワードプライマーの伸長生成物が生成する。

【0006】この場合、レポーター1とクエンチャー2がプローブに結合している間に近い位置にある両者の相互作用により蛍光を発しないが、プライマーの伸長と共にプローブを構成するオリゴヌクレオチドが分解されればレポーター1とクエンチャー2が切り離され、レポーター1はクエンチャー2の作用を受けないので紫外線の照射により蛍光を発する。従って、特定のDNAに特異的にハイブリダイズするプライマー及びプローブを選択することにより、蛍光強度によって特定の核酸を選択的に測定することができる。この方法はすでにTaq ManPCR(商標)等として広く使用されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記の方法においては、被験核酸、すなわち鋳型核酸上の上記のごとき位置関係にある1対のプローブ、及びプローブを選択する必要があるが、それのみならず同一のハイブリダイゼーシ

ョン条件下でプライマーよりも早くプローブが鋳型核酸にハイブリダイズしなければならない。なぜなら、プライマーの伸長生成物(1本鎖核酸)がプローブがハイブリダイズすべき位置を超えて伸長してしまえば、もはやプローブがハイブリダイズすることができず、従ってDNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により分解されることもできないからである。

【0008】特定のヌクレオチド配列が既知である2つの核酸がハイブリダイズする場合のハイブリダイズの生じやすさは、融点(Tm)の計算によりある程度推定することができる。しかしながらこの推定によって選択したプライマーとプローブとの組合せが、必ずしも上記DNA測定法において好結果をもたらすわけではなく、測定すべき特定の核酸につき試行錯誤によりプローブとプライマーの組合せを選択する必要がある。

【0009】本発明は、例えば、抗炎症活性を有する薬剤等の評価又は選択のための、簡便で、効率的で、多数の被験物質を短時間で評価することができる手段を提供しようとするものであり、そのために、エオタキシン、RANTES又は $\beta$ -ディフェンシン-2をコードする遺伝子の発現量、すなわちmRNA量を測定するための手段として、前記のPCR法を使用する。そして、本発明は、上記PCR法の実施のために特に適するプライマー対及びプローブを提供するものである。そこで本発明は、エネルギーの短絡的消費を促進することが知られているエオタキシン、RANTES又は $\beta$ -ディフェンシン-2につき、これらをコードする核酸の測定のために有効なプライマーとプローブとの特定の組合せを提供しようとするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するため、本発明は、フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってmRNA又はcDNAを測定する方法において、下記の前記プライマー対及びプローブを使用する。

【0011】(1)エオタキシンをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてエオタキシンをコードする核酸のヌクレオチド170～189の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド301～320の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド191～223の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0012】エオタキシンをコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域の位置関係を図2に

示す。この配列は、Kitaura, M.ら、J. Biol. Chem. Vol. 271 No. 13, p. 7725-7730 (1996)に記載されているヒトのエオタキシンをコードするcDNAの塩基配列である。この配列を配列番号：1に示し、図2の配列の1位が配列番号：1の配列の1位に相当する。図2において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域でありそしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプロンプがハイブリダイズする領域である。

【0013】エオタキシン遺伝子測定用の好ましいプライマー対及びプロンプのヌクレオチド配列は次の通りである（図2において、それぞれ右方向の矢印を付した下線及び左方向の矢印を付した下線、並びにその間の矢印のない下線により示す）。

フォワードプライマー 5' -GCCAGCTCTCTGCCAACCA-3' (配列番号：4)

リバースプライマー 5' -GGCACAGATATCTTGGCCA-3' (配列番号：5)

プロンプ 5' -CTGCTGCTTTAACTGGCCATAGGAGATACC-3' (配列番号：6)。

【0014】(2) RANTESをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてRANTESをコードする核酸のヌクレオチド50～71の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド274～300の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プロンプとして前記核酸中のヌクレオチド73～94の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0015】RANTESをコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプロンプ結合領域の位置関係を図3に示す。この配列は、Schall, T.J.ら、J. Immunol. Vol. 141, p. 1018-1025 (1988)に記載されているヒトのRANTESをコードするcDNAの塩基配列である。この配列を配列番号：2に示し、図3の配列の1位が配列番号：2の配列の1位に相当する。図3において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域でありそしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプロンプがハイブリダイズする領域である。

【0016】RANTES遺伝子測定用の好ましいプライマー対及びプロンプのヌクレオチド配列は次の通りである（図3において、それぞれ右方向の矢印を付した下線及び左方向の矢印を付した下線、並びにその間の矢印のない下線により示す）。

フォワードプライマー 5' -CGCTCTCATCTCACTGCTACT-3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5' -AGCTCATCTCCAAAGAGTGTGATGATCT-3' (配列番号：8)

プロンプ 5' -CCCTCTGCGCTCTGTCATCTGC-3' (配列番号：9)。

【0017】(3)  $\beta$ -ディフェンシン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとして $\beta$ -ディフェンシン-2をコードする核酸中のヌクレオチド84～104の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド276～295の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プロンプとして前記核酸中のヌクレオチド108～139の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0018】 $\beta$ -ディフェンシン-2をコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプロンプ結合領域との位置関係を図4に示す。この配列を配列番号：3に示し、図4の配列の1位が配列番号：3の配列の1位に相当する。図4において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域であり、そしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプロンプがハイブリダイズする領域である。

【0019】 $\beta$ -ディフェンシン-2遺伝子測定用の好ましいプライマー対及びプロンプのヌクレオチド配列は次の通りである（図4において、それぞれ右方向の矢印を付した下線及び左方向の矢印を付した下線、並びにその間の矢印のない下線により示す）。 $\beta$ -ディフェンシン-2遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプロンプのヌクレオチド配列は次の通りである。

フォワードプライマー 5' -GCCTCTTCAGGTGTTTGGG-3' (配列番号：10)

リバースプライマー 5' CGCACGCTCTCTGATGAGGGA-3' (配列番号：11)

プロンプ 5' -TATAGGCGATCTGTTAACTGCCTTAAGAGTGG-3' (配列番号：12)。

【0020】本発明においてはさらに、ヌクレオチド配列が知られている核酸を特異的に測定することができることが確認されているプライマー及びプロンプを用いて該核酸を測定し、これを対照として用いることができる。この線な対照としてグリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を用いることができる。この場合、グリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド66～84の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、他方のプライマーとしてヌクレオチド272～291の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、そしてプロンプとしてヌクレオチド242～262の領域のオリゴヌクレオチドを用いて、グリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子上のプライマーとプロンプとの位置関係を図5に示す。この図において、

【0021】グリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子上のプライマーとプロンプとの位置関係を図5に示す。この図において、

3本の下線を付した領域の意味は図2について記載した通りである。グリセオアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである。

【0022】フォワードプライマー 5' GAAGGTGAAGGTGGAGTC (配列番号: 13)

リバープライマー 5' GAAGATGGTGTGGGATTTC (配列番号: 14)

プローブ 5' AGGCTGAGAACGGGAGCTGT (配列番号: 15)

上記の種々のプライマー及びプローブ用のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド数は15~40個、そして好ましくは20~30個である。プライマー及びプローブのサイズが長ければ、1本鎖DNAにハイブリダイズしにくくなり、短かすぎればハイブリダイゼーションの特異性が低下するからである。

【0023】プライマー及びプローブの上記の特定のヌクレオチド配列は特に好ましい配列であるが、例えば20ヌクレオチドからなるプライマー又はプローブは、鋳型鎖との間に少数のミスマッチが存在してもハイブリダイズし、PCRのプライマーとして、又は検出用プローブとして機能し得ることが知られている。従って本発明プライマー及びプローブは、上記の特定のヌクレオチド配列を有するものに限定されず、例えば上記の具体的なヌクレオチド配列に対して4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加により修飾されており、且つ所定の

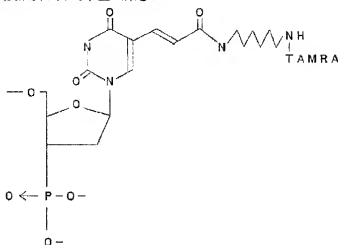
領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブも本発明に含まれる。

【0024】本発明に用いるプローブはその一端、例えば5'-末端にレポーター色素を結合しており、そして他端、例えば3'-末端にクエンチャー色素を結合している。レポーター色素が例えば紫外線の照射によって蛍光を発する物質であるのに対して、クエンチャーは、該レポーター色素に距離的に接近して存在する場合レポーター色素に作用して蛍光の発生を消去する作用を有するものである。レポーター色素としては、例えば6-カルボキシルフルオレッセイン (FAM)、テトラクロロ-6-カルボキシルフルオレッセイン (TET)、7-ジメトキシ-4, 5-ジクロロ-6-カルボキシルフルオレッセイン (JOE)、ヘキサクロロ-6-カルボキシルフルオレッセイン (HEX) 等が挙げられ、他方クエンチャー色素としては6-カルボキシテトラメチルローゲミン (TAMRA) 等が使用される。

【0025】プローブオリゴヌクレオチドへのレポーター色素及びクエンチャー色素の結合は、例えばプローブの5' 側は、通常数個のメチレン鎖をリンカーとし、末端のリン酸基にFAM 分子をリン酸エステル形で結合し、また、3' 側については下に示す構造単位を介し、アミド結合によりTAMRA 分子を結合する。

【0026】

【化1】



【0027】本発明の方法は、本発明が対象とする、例えば抗炎症作用を有する薬剤を評価又は選択するために、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2の発現量の測定方法として、mRNAを測定する場合に特に有用である。この場合は、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシンの発現を測定しようとする生物体の組織又は細胞を被験物質の存在下で培養し、培養細胞から常法に従ってmRNAを抽出し、次にそれに対して相補性のcDNAを常法に従って合成した後、本発明のプライマーとプローブを用いて、PCRを行えばよい。本発明はさら

に、上記の方法の実施のために使用されるキットをも提供する。このキットは上に定義したプライマー及びプローブを含んで成る。本発明のキットはさらに、対照として使用する核酸及びその核酸を測定するためのプライマー及びプローブを含んでいてもよい。

【0028】本発明の方法は、本発明が対象とする、例えば抗炎症作用を有する薬剤を評価又は選択するために、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2の発現量の測定方法として、mRNAを測定する場合に特に有用である。この場合は、特定のサイトカインの発現を

測定しようとする生物体の組織を採取し、常法に従って mRNA を抽出し、次にそれに対して相補性の cDNA を常法に従って合成した後、本発明のプライマーとプローブを用いて、PCR を行えばよい。本発明はさらに、上記の方法の実施のために使用されるキットをも提供する。このキットは上に定義したプライマー及びプローブを含んで成る。本発明のキットはさらに、対照として使用する核酸及びその核酸を測定するためのプライマー及びプローブを含んでいてもよい。

【0029】本発明の方法の実施のために使用する細胞としては、エオタキシン、RANTES 又は  $\beta$ -ディフェンシン-2 を発現し得る任意の動物細胞を使用することができ、例えば線維芽細胞又は、この細胞の培養細胞株等を使用することができ、これらの細胞や組織の由来としては、マウス、ラット、ヒト等の任意の動物からの細胞や組織を使用することができるが、ヒトの細胞を用いるのが好ましい。

【0030】ヒト皮膚線維芽細胞は、市販されており、例えばクラボウ（倉敷紡績株式会社）から入手可能である。ヒト線維芽細胞の培養は、動物細胞を培養するための常法に従って行えばよいが、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地（グルベコ変法イーグル培地）が特に好ましい。

【0031】本発明のスクリーニング方法の実験においては、細胞を上記の培地中で、被検物質の存在下、及び対照としての非存在下で培養する。培養は 37℃ において、5 時間〜24 時間行えばよい。培養後、RNA の単離及び cDNA の合成を行い、PCR を実施する。RNA の単離及び cDNA の合成については、実施例の項において記載する。PCR は常法に従って行えばよい。

【0032】本発明の測定対象となる遺伝子がコードしているケモカインあるいは  $\beta$ -ディフェンシン-2 は、次のごとく皮膚の炎症反応あるいは皮膚の抗菌性と関連している。

エオタキシン：好酸球、好塩基球にメインに作用するケモカインのうち、特に好酸球に特異的に作用する。好酸球の遊走・脱顆粒を引き起こす。アトピー性皮膚炎・寄生虫感染など機性のアレルギーにおいて重要な役割を果たす。皮膚線維芽細胞が産生することが知られている。

【0033】RANTES：エオタキシンと同様に好酸球に対する作用で注目されているケモカイン。エオタキシンよりも作用するレセプター種が多く、CD45 陽性メモリー T 細胞に対しては遊走因子として働くことから T 細胞の活性化にも重要と考えられている。皮膚線維芽細胞や角化細胞が産生することが知られている。

$\beta$ -ディフェンシン-2：皮膚角化細胞などの上皮系の細胞が産生する抗菌ペプチド。多くの種類の菌に対し、広く抗菌作用を有する。乾癬患者の皮膚から最初に見出された。アトピー性皮膚炎患者の黄パ菌との関連などについて注目されている。

## 【0034】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

### 一般的方法

#### RNA の単離

細胞を 2.2ml のチューブに入れ、2000 $\times$ g、5 分間、4℃ で遠心を行い培養液を除去する。残った細胞に ISOGEN（ニッポンジーン）を 1ml 加え、撹拌し室温で 5 分間放置する。

【0035】0.2ml のクロロホルムを加え、15 秒間撹拌を行う。2〜3 分間、室温で放置後 12000 $\times$ g、15 分間、4℃ で遠心後上層を別のチューブに移す。それに 0.5ml のイソプロパノールを加え、5〜10 分間室温で放置後 12000 $\times$ g、10 分間、4℃ で遠心を行い、沈殿物を得る。得られた沈殿物に 75% エタノールを加え、12000 $\times$ g、5 分間、4℃ で遠心を行い、沈殿物を得る。沈殿物を風乾後、蒸留水に溶かす（この溶液を RNA 溶液とする。）。

#### 【0036】cDNA の合成

1  $\mu$ g の RNA を含む RNA 溶液 10.5  $\mu$ l に 5X First Strand Buffer (Gibco BRL) 4  $\mu$ l、0.1 M DTT (Gibco BRL) 2  $\mu$ l、0.5mg/ml oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (Gibco BRL) 1  $\mu$ l、2.5mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (室酒造) 1  $\mu$ l、124 U/ $\mu$ l RNase Inhibitor (室酒造) 0.5  $\mu$ l、200 U/ $\mu$ l M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL) 1  $\mu$ l の混合液を室温で 10 分間放置後、37℃ で 50 分間インキュベートする。

#### 【0037】cDNA の測定

cDNA 5  $\mu$ l、10X PCR 緩衝液 (Perkin Elmer) 5  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer) 7  $\mu$ l、20 mM フォワードプライマー-0.75  $\mu$ l、20 mM リバースプライマー-0.75  $\mu$ l、3 mM プローブ 5  $\mu$ l、2.5mM dATP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、2.5mM dGTP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、2.5mM dCTP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、5mM dUTP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、蒸留水 21.75  $\mu$ l、AmpliTaq<sup>®</sup> UNG (Perkin Elmer) 0.5  $\mu$ l、AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Perkin Elmer) 0.25  $\mu$ l の混合液を ABI PRISM7700 (Perkin Elmer) にセットし、PCR 反応を行う。温度条件は、50℃ で 2 分間、95℃ で 10 分間で保温した後に、(95℃ で 15 秒間、60℃ で 1 分間) のサイクルを 40 回行い、各サイクルごとに蛍光強度を測定する。

#### 【0038】実施例 1 エオタキシンをコードする遺伝子の測定における標準曲線

エオタキシンをコードする遺伝子（鋳型）の初期分子量（濃度）と、蛍光強度がベースラインから脱離して増加し始めるまでの PCR のサイクル数 (Threshold Cycle) C<sub>t</sub> との関係を試験した。鋳型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

【0039】鋳型：エオタキシン (Kilaura et al. J. Biol. Chem. Vol. 271, No. 13, p. 7725-7730 (1996))



フォワードプライマー：配列番号：4

リバースプライマー：配列番号：5

プローブ：配列番号：6

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

結果を図6に示す。これらの結果、遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）と  $C_T$  の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

#### 【0040】実施例2. RANTESをコードする遺伝子の測定における標準曲線

RANTESをコードする遺伝子（鋳型）の初期分子量（濃度）と、蛍光強度がベースラインから離脱して増加し始めるまでのPCRのサイクル数(Threshold Cycle)  $C_T$  との関係を試験した。鋳型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

【0041】鋳型：RANTES (Schall, T.J. et al., J. Immunol. Vol. 141, p. 1018-1025 (1988))

フォワードプライマー：配列番号：7

リバースプライマー：配列番号：8

プローブ：配列番号：9

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

結果を図7に示す。これらの結果、遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）と  $C_T$  の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

#### 【0042】実施例3. $\beta$ -ディフェンシン-2をコードする遺伝子の測定における標準曲線

$\beta$ -ディフェンシン-2をコードする遺伝子（鋳型）の初期分子量（濃度）と、蛍光強度がベースラインから離脱して増加し始めるまでのPCRのサイクル数(Threshold Cycle)  $C_T$  との関係を試験した。鋳型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

【0043】鋳型： $\beta$ -ディフェンシン-2

フォワードプライマー：配列番号：10

リバースプライマー：配列番号：11

プローブ：配列番号：12

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

結果を図8に示す。これらの結果、遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）と  $C_T$  の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

#### 【0044】実施例4. エオタキシンの発現に対するIFN- $\gamma$ 及びIL-4の影響

ヒト線維芽細胞を直径6cmの培養皿でコンフルエントになるまで、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養し、実験に供した。種々の濃度のTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4を添加し、24時間、37°Cで培養した。次に細胞からRNAを単離し、cDNAを合成したのち、本発明の方法に従い、エオタキシン遺伝子の発現量を測定した。その結果、図9に示す通り、エオタキシンの発現に対して、IL-4は亢進作用を示し、IFN- $\gamma$ は抑制作用を示した。

#### 【0045】実施例5. RANTESの発現に対するIFN- $\gamma$ 及びIL-4の影響

ヒト線維芽細胞を直径6cmの培養皿でコンフルエントになるまで、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養し、実験に供した。種々の濃度のTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4を添加し、24時間、37°Cで培養した。次に細胞からRNAを単離し、cDNAを合成したのち、本発明の方法に従い、RANTES遺伝子の発現量を測定した。その結果、図10に示す通り、RANTESの発現に対して、IL-4は抑制作用を示し、IFN- $\gamma$ は亢進作用を示した。

#### 【0046】実施例6. $\beta$ -ディフェンシンの発現に対するIFN- $\gamma$ 及びIL-4の影響

ヒト線維芽細胞を直径6cmの培養皿でコンフルエントになるまで、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養し、実験に供した。種々の濃度のTNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ を添加し、24時間、37°Cで培養した。次に細胞からRNAを単離し、cDNAを合成したのち、本発明の方法に従い、RANTES遺伝子の発現量を測定した。その結果、図11に示す通り、 $\beta$ -ディフェンシン2の発現はTNF- $\alpha$ 及びIL-1 $\alpha$ により誘導された。

【0047】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```
<110>; Shiseido
<120>; Method for measuring nucleic acid encoding eotaxin, RANTES or beta-defensin-2 and kit therefor
<130>;
<160>;
```

【0048】

```
<210>; 1
<211>; 807
<212>; DNA
<213>; Homo sapiens
```

<;223>; Nucleotide sequence of DNA encoding human eotaxin  
 <;400>; 1  
 gcattttttc agttttatg atttatttaa cttgtggaac aaaataaac cagaaccac 60  
 cactctcac gccaaagctc acaccttcag cctccaacat gaaggtctcc gcagcattc 120  
 tgttgctgt getcatagca getgccttca gcccccagg gctcgtctgg ccagctcttg 180  
 tcccaaccac ctctgctttt aacctggcca ataggaaat accccttcag cactataga 240  
 gctacaggag aatcaccagt ggcacaatgt cccagaagc tgtgatcttc aagaccaac 300  
 tggccaagga tatctgtgcc gaccocaaga agaagtgggt gcaggatcc atgaagtatc 360  
 tggaccaaaa atctccaact ccaaaagccat aaataatcac catttttgaa accaaaccag 420  
 agcctgagtg ttgctaatt lgttttccct tcttacaatg cattctgagg taacctcatt 480  
 atcagtccaa agggcatggg ttttattata tatatatata tttttttt aaaaaaaac 540  
 gtattgcatt taattattg aggettataa acttatctc catgaatcc agtattttt 600  
 aactglaaa gctltgtgca gattctllac cccctggag ccccaallcg atccccgtc 660  
 acgtgtgggc aatgttcccc ctctctctc ttccctccgt gaacttllga aaggtccclg 720  
 caaagatgat cagtatgaat atgtcatgtg tcttgtgaac ccaaaagtgt actcaataa 780  
 tggaaataa tgttgtttta ggaatcac 807

[0049]

<;210>; 2  
 <;211>; 1160  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;223>; Nucleotide sequence of DNA encoding human RANTES  
 <;400>; 2  
 cctccgacag cctctcaca ggtaccatga aggtctccc ggcagcctc cgtgtcatcc 60  
 tcatgtctac tgcctctgc gctctctcat ctgctctccc atattctctg gacaccacac 120  
 ctctgctgt tgcctacatt gccccgccac tgcctctgc ccacatcaag gctatattct 180  
 acaccagtgg caagtgtctc aaccagcagc tctgttttgt caccgaaag aaccgcag 240  
 tgtgtgcaa cccagagaag aaatgggttc gggagatcat caactcttg gagatgagct 300  
 agaatggaga gtctctgaac ctgaacttac acaatttgc ctgttctgc ttgctctgt 360  
 cctagcttgg gagctctcc ctactatcc taaccacccc gctcttga aaggccagat 420  
 tctgacacag acagacacga gttacaaaa ccttcccag cgtggacgtg gtggctcagc 480  
 ctllglaacc cagcactllg gtaggccaag gtaggagat cacttgaggt caggagttcg 540  
 agacagcttg gcccaacatga tgaacccca tglgtactaa aatatacaaa aattagccg 600  
 gctgtgtgac gggcgcctgt agtccagct actcggagg ctgaggcagg agaatggct 660  
 gaaccggga gcggagcttg cagtggcgc agatgcgcc actgcactcc agcctggcg 720  
 acagagcggg actcgtctc aaaaaaaaa aaaaaaaa aaaaataca aaattagcc 780  
 ggltgtgac ccagcctgt aatccagct actcggagg ctaaggcagg aaattgtt 840  
 gaaccaggga ggtggagctt gcagtgaact gagattgtc cacttactc cagctgggt 900  
 gacaagtga gacttcgta caacaaacac aacaaaaag ttcccaact aaagcctaga 960  
 agagctcttg aggcgtctt ttgtcaaaag gaagtctcta gttctgagc tctgctttg 1020  
 ccttgctttt gaaagggtc tgtgacaagg aaggaaatca gcatgctct agagcaagg 1080  
 aaggagagaa cactgactc ttaagctcc gccgtctcaa cctctcacg gagcttactg 1140  
 gcaaacatga aaatcggg 1160

[0050]

<;210>; 3  
 <;211>; 336  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;223>; Nucleotide sequence of DNA encoding human beta-defensin-2  
 <;400>; 3

```

agactcagct cctggtgaag ctcccagcca tcagccatga gggctcttga tctctcttc 60
tgcttctctt tcatattcct gatgcctctt ccaggtgttt ttggtggat aggcatacct 120
gttaccctgc ttaagagtgg agccataigt catccagtct ttgccctag aaggtataaa 180
caaatlggca cctgtggtct ccttggaaca aaatgctgca aaaagccatg aggaagccaa 240
gaagctgctg tggctgatgc ggattcagaa agggctccct catcagagac gtgcagcatg 300
taaaccaaat taaactatgg tgcctcaaga tacgca 336

```

【0051】

```

<210>; 4
<211>; 20
<212>; DNA
<213>; Artificial Sequence
<220>;
<223>; Forward primer for amplification of human gene for eotaxin
<400>; 4
gccagcttct gtcccaacca 20

```

【0052】

```

<210>; 5
<211>; 20
<212>; DNA
<213>; Artificial sequence
<220>;
<223>; Reverse primer for amplification of human gene for eotaxin
<400>; 5
ggcagagata tccitggcca 20

```

【0053】

```

<210>; 6
<211>; 33
<212>; DNA
<213>; Artificial Sequence
<220>;
<223>; Probe for detection of human eotaxin
<400>; 6
ctgctgcttt aacctggcca ataggaagat acc 33

```

【0054】

```

<210>; 7
<211>; 22
<212>; DNA
<213>; Artificial Sequence
<220>;
<223>; Forward primer for amplification of human gene for RANTES
<400>; 7
cgtctctatc ctctattgcta ct 22

```

【0055】

```

<210>; 8
<211>; 27
<212>; DNA
<213>; Artificial sequence
<220>;
<223>; Reverse primer for amplification of human gene for RANTES
<400>; 8

```

|        |  |    |
|--------|--|----|
|        | agctcatctc caaagagttg atgtact  | 27 |
| 【0056】 | <210>: 9<br><211>: 22<br><212>: DNA<br><213>: Artificial Sequence<br><220>:<br><223>: Probe for detection of human gene for RANTES<br><400>: 9<br>ccctctgcgc tctgtcatct gc   | 22 |
| 【0057】 | <210>: 10<br><211>: 21<br><212>: DNA<br><213>: Artificial Sequence<br><220>:<br><223>: Forward primer for amplification of human gene for beta-defensin-2<br><400>: 10<br>gctctctcca ggtgtttttg g                  | 21 |
| 【0058】 | <210>: 11<br><211>: 20<br><212>: DNA<br><213>: Artificial Sequence<br><220>:<br><223>: Reverse primer for amplification of human gene for beta-defensin-2<br><400>: 11<br>cgcacgtctc tgaatgaggga                   | 20 |
| 【0059】 | <210>: 12<br><211>: 33<br><212>: DNA<br><213>: Artificial Sequence<br><220>:<br><223>: Probe for detection of human gene for beta-defensin-2<br><400>: 12<br>tataggcgat ccgtgtacct gccttaagag tgg                  | 33 |
| 【0060】 | <210>: 13<br><211>: 19<br><212>: DNA<br><213>: Artificial Sequence<br><220>:<br><223>: Forward primer for amplification of gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase<br><400>: 13<br>gaaaggtgaag gtccgagtc | 19 |
| 【0061】 | <210>: 14<br><211>: 20   |    |

```

<212>: DNA
<213>: Artificial Sequence
<220>:
<223>: Reverse primer for amplification of gene for glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<400>: 14
gaagatggtg atgggatttc

```

20

【0062】

```

<210>: 15
<211>: 21
<212>: DNA
<213>: Artificial Sequence
<220>:
<223>: Probe for detection of gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<400>: 15
aggctgagaa cgggaagctt g

```

21

【0063】

```

<210>: 16
<211>: 360
<212>: DNA
<213>: Homo sapiens
<223>: Partial nucleotide sequence of rat gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<400>: 16
gtctggctgg cgacgcaaaa gaagatgcgg ctgactgtcg asccacatcg ctacagacc 60
atggggaagg tgaaggcgg agtcaacgga ttggtcgta ttgggcgctt ggtcaccagg 120
gtctgtttta actctggtaa agtggatatt gttgcacat atgacctt catgaactc 180
aactacatgg ttacatggtt ccaatatgat tccaccatg gcaaatcca tggcaccgtc 240
aaggtgaga acgggaagct tgtcatcaal ggaalacca tcaacalell ccaggagcga 300
gacctctcca aatatcaatg gggcgtatgt ggcgtgagt acgtctgga gtccactggc 360

```

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の測定法の原理を示す図である。

【図2】図2は、エオタキシンをコードするヒト由来のcDNAのヌクレオチド配列と、それに対するプライマー及びプロンプの位置を示す図である。

【図3】図3は、RANTESをコードするヒト由来のcDNAのヌクレオチド配列と、それに対するプライマー及びプロンプの位置を示す図である。

【図4】図4は、 $\beta$ -ディフェンシン-2をコードするヒト由来のcDNAのヌクレオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプロンプの位置を示す図である。

【図5】図5は、グリセロールデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプロンプの位置を示す図である。

【図6】図6は、エオタキシンをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と  $C_t$  との関係を示すグラフである。

【図7】図7は、RANTESをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と  $C_t$  との関係を示すグラフである。

【図8】図8は、 $\beta$ -ディフェンシン-2をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と  $C_t$  との関係を示すグラフである。

【図9】図9は、エオタキシンの発現に対するIFN- $\gamma$ 及びIL-4の影響を示すグラフである。

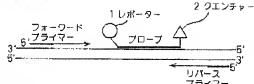
【図10】図10は、RANTESの発現に対するIFN- $\gamma$ 及びIL-4の影響を示すグラフである。

【図11】図11は、 $\beta$ -ディフェンシンの発現に対するTNF- $\alpha$ 及びIL-1 $\alpha$ の影響を示すグラフである。

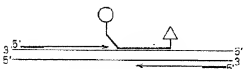
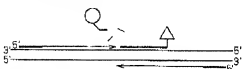
【図1】

図1

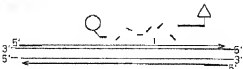
(A) 伸長反応開始



(B) 伸長反応

(C) 5'→3' スクウェア型活性によるリポーター色素の  
プローブからの解離

(D) 伸長反応終了



【図2】

エアダキシンをコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 1)

1 gcattttttc agtttttttg atttttttaa attgttggaac aaaaataaac cagaaacac  
 51 cactctcacc gccaaagctc acactctcag cctccaaacat gaaggtctcc gaagcaattc  
 121 tgtgtgtgtc gctcattagca gctgacttca gcccccaggc gctcgtggg cagattcttg  
 181 ccccacccgc ctgtgctctt acactggcca ataggagatg acactcttcg cactcagaga  
 241 gctacaggag atcacacagt gccaaagtcc cccagaaagc tgtgatcttc aagaccaaac  
 301 ggccacagga tctctgtacc gcccccagga agaatgggtt gcaggcttcc atgaagtato  
 361 tggacccaaa atctccaaat cccaaagcat aatatctac cactttttaa acnaaacacg  
 421 agctgagtg ttgcctaa llgllllccol lollaaagt cactttgagg taactctatt  
 481 atcgtctcaa aggcactggg tttttatata tctatatata ttttttttt aaaaaaaac  
 541 gtattgctat tcttttttg aggtttttaa acttatctcc atgcatctac agttattttt  
 601 aaactgaaa golltttgca gattttttac cccctgggag ccccaattcg atccctctgc  
 661 acgtgtgggc atgttctccc ctctctctcc ttccctctg gacttttga aagttccttg  
 721 caaagctgat cagtatgaaa atgtactgtt tctgttgacc ccaaatgttg actattttaa  
 781 tggaaatga ttgtttttta ggaatac

【図3】

RANTESをコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 2)

1 cctctgagag cctctccaaa ggtacacatg agttctcaga ggaacagctc gtatctctaa  
 81 taattctaaa tccctctctc gctctctcat atgtctcaca atattctctg gaaacacac  
 121 cctgtgtgtt tgcctcactt gccgcacac tgcctcgtgc ccaactcag gactattct  
 181 aaacacatgc caagtctccc aacccacagc tgcctctgtt ccccccagag cccgcacag  
 241 ttgtctcaca cccagagag aattctctc aaagctctct cactctcttc gactctcct  
 301 agaatggaga gctcttgaa ctgacattac acaatttgc atgtttctga ttgtctttat  
 361 cctagttaa gactctccc ctactctac taccacacac gctcttga gacccacagt  
 421 tctgacacag aagagcagca gtctcaaaa cctcccccag gctgacatgc gtactcaga  
 481 ctgtctacac cagacttta gacgcacac gtgtgtgtt caattgagt caggagtctg  
 541 agacagctg gccacactga tgaacccaa ttgtctctaa aaacaaaaa attagctcag  
 601 gctgtctaga gggcctctg actccacact cctcggagc atgacagaa agaatctgt  
 661 gaaacccgga gacagcttg cagtgtgct agatcgagc actgacatcc agcttgagc  
 721 cagagctgag actcgtctc aaaaaaaac aaaaaaaac aaaaaaaac aaattagcc  
 781 cctctctaac cccgcctgt actccacact cctcggagc atgacagaa aaattgatt  
 841 gaaacacaga gctgacact gactgactg gactgttgc cctccatcc cactgactg  
 901 gaaacacaga gactcctga caaacacac aaacaaagc ttccacact aagcttga  
 961 agactctg agactgctg ttgtcaaac gaactctca gctctgaga tctgtgttg  
 1021 cctgtctgtt gaaagctga ttgtcaaac aagacttga gactgctg agacacag  
 1081 aagacagaa cactgactg tgaacttc cactgctga cctctcag gacttactg  
 1141 gaaacacaga aaattgagc

図  
2

【図4】

β-アフィニン-2 をコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 3)

図  
7

```

agactcagct cctggtgag ctccagcca tcagccatga ggtattgta      50
tctctcttct tcttctctct tcatattct gatgctctt ccaggtgttt      100
ttagtgttat agcagatcct gttacctccc ttaagcttag agccatatgt      150
ctccagctct ttgcccctg aaggtataaa caaattgca cctgtggtot      200
ccctggcaac aatgctgca aaaaacctg agcaggccaa gaagctgctg      250
tgctgctgc gattccaga aggcctcct cctcaggagc gtccgacatg      300
taaaccaaat taactatgg tgcacaaga taagca

```

【図5】

(F) GAPDH (配列番号: 16)

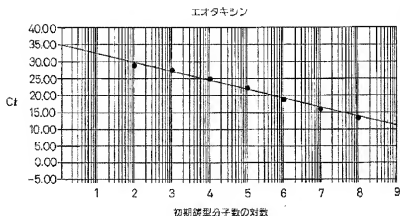
図  
5

```

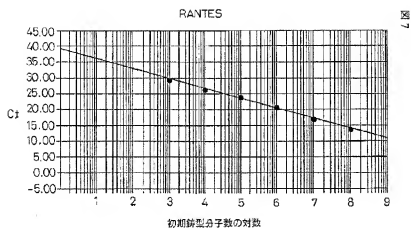
gtctggcttg cgaagcaaaa gaagatggcg ctgactgtcg agccaatcgc ctacagacc      60
atggggaggg igaaggtcgg agtcaacgga ttgtctgta ttggcgccct ggctaccagg      120
gtctgtttta accttggtta agtggtatt gtggcatca atgacctt cttgacctc      180
aactacstag tttaatggt ccaatatga tccacccatg gcaaatcca tggcacogtc      240
aaggtctaga acgggaagct tgtcaatca ggaatccca tccactcct ccaggagaga      300
gatccctcca aaatcaagtg gggcgatgct ggcctgagt acgtgtgga gtccactggc      360

```

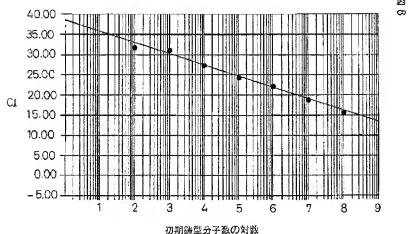
【図6】

図  
6

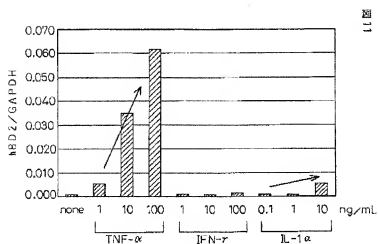
【図7】



【図8】

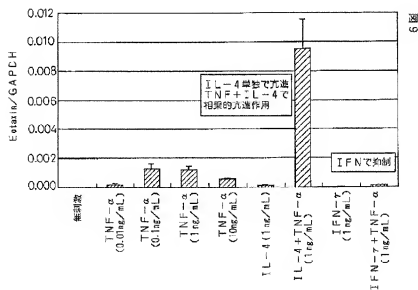


【図11】

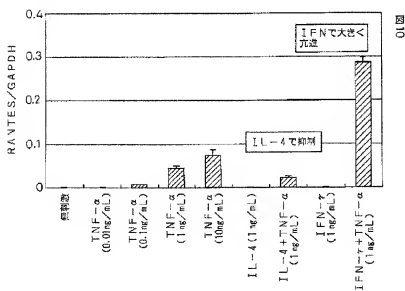




【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

FI

サーチワード (参考)

G 01 N 33/15

G 01 N 33/50

Z

33/50

33/53

M

33/53

33/566

33/566

C 12 N 15/00

Z N A A

(72)発明者 市川 秀之

神奈川県金沢区福浦2-12-1 株式会社  
資生堂リサーチセンター内

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA40 CB01 CB30 DA12

DA13 DA14 DA36 DA80 FB02

FB12 FB20 GC15

4B024 AA01 AA11 BA08 BA21 CA04

CA09 FA10 GA11 HA12

4B063 QA01 QQ08 QQ24 QQ43 QQ53

QR32 QR55 QR62 QS25 QS32

4C084 AA17 NA14 ZB112 ZB132